






METHOD FOR PURIFYING AND EVENTUALLY ANALYZING NUCLEIC ACIDS FROM BIOLOGICAL TEST SAMPLES

Publication number: WO9812351
Publication date: 1998-03-26
Inventor: ROTH W KURT (DE); WASCHK DOROTHEE (DE);
ZEUZEM STEFAN (DE)
Applicant: ROTH W KURT (DE); WASCHK DOROTHEE (DE);
ZEUZEM STEFAN (DE)
Classification:
- **international:** **C12N15/10; C12Q1/68; C12N15/10; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68**
- **European:** C12N15/10A; C12N15/10A2B; C12Q1/68A4
Application number: WO1997EP05129 19970918
Priority number(s): DE19961038362 19960919; DE19971031670 19970723

Cited documents:

 DE4136322
 EP0270017
 FR2391730
 JP6023281
 JP7277993
more >>

Report a data error here

Abstract of WO9812351

The invention concerns a method for purifying and eventually analyzing nucleic acids from biological test samples. In said method the test sample containing nucleic acid is made to react with an anion-exchanging synthetic resin, which has a preferably high bonding affinity with bile acid. The possible existing inhibitors for the eventually ensuing nucleic acid analysis reaction are bonded and separated by the anion-exchanging synthetic resin.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/12351 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. März 1998 (26.03.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05129 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. September 1997 (18.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 38 362.5 19. September 1996 (19.09.96) DE 197 31 670.0 23. Juli 1997 (23.07.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: ROTH, W., Kurt [DE/DE]; Kaiser-Friedrich-Ring 33, D-65185 Wiesbaden (DE). WASCHK, Dorothee [DE/DE]; Holzheimer Strasse 40 a, D-65549 Limburg (DE). ZEUZEM, Stefan [DE/DE]; Carl-Seemann-Weg 3, D-63303 Dreieich (DE). (74) Anwalt: PELLMANN, Hans-Bernd; Tiedtke-Bühling-Kinne, Bavariaring 4, D-80336 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: METHOD FOR PURIFYING AND EVENTUALLY ANALYZING NUCLEIC ACIDS FROM BIOLOGICAL TEST SAMPLES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG UND GEGEBENENFALLS ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN AUS BIOLOGISCHEN PROBEN (57) Abstract The invention concerns a method for purifying and eventually analyzing nucleic acids from biological test samples. In said method the test sample containing nucleic acid is made to react with an anion-exchanging synthetic resin, which has a preferably high bonding affinity with bile acid. The possible existing inhibitors for the eventually ensuing nucleic acid analysis reaction are bonded and separated by the anion-exchanging synthetic resin. (57) Zusammenfassung Es wird ein Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben beschrieben, wobei das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäure-haltige Probe mit einem Anionenaustauscher-Kunstharz umgesetzt wird, welches eine, vorzugsweise hohe, Bindungsaffinität zu Gallensäuren besitzt, wobei die möglicherweise vorhandenen Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analysereaktion an das Anionenaustauscherharz gebunden und abgetrennt werden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung und gegebenenfalls Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben.

Die Reinigung von Nukleinsäuren spielt eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie. Vor allem die DNA dient als Ausgangsmaterial für genetische Analysen in der labordiagnostischen Forschung und im routinemäßigen Einsatz.

Die Isolierung von Nukleinsäuren wie DNA und RNA aus biologischen Proben, insbesondere aus Proben des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel Blut, Körpersekreten, Gewebeproben, Urin, Stuhl u. dergl., zum nachfolgenden Einsatz in genetischen Analysen kommt eine besondere Bedeutung zu, insbesondere im Hinblick auf ein Screening in der Tumordiagnostik sowie zur Diagnose infektiöser Agentien wie Viren oder Bakterien.

So ist zum Beispiel die Analyse der DNA, die aus abgeschilferten Darmepithelzellen von Stuhlproben stammt, von besonderem Interesse zur Diagnostik kolorektaler Tumoren. Von großem Interesse ist auch eine Isolierung der Nukleinsäure aus dem Vollblut, um die isolierte Nukleinsäure einer genetischen Analyse zugänglich zu machen.

Insbesondere soll die dabei anfallende DNA in hoher Reinheit vorliegen und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können.

Eine Nukleinsäure-Diagnostik unter Einsatz von DNA-Amplifikationsansätzen, insbesondere der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, im Folgenden mit PCR abgekürzt) (s. Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988), Science 239: 487-491), eröffnet vielfältige Ansätze zu einer spezifischen und zugleich sensitiven DNA-Diagnostik, z.B. von Tumoren im Frühstadium, die nicht belastend und für ein Screening gut geeignet sind. Aufgrund der häufig geringen DNA-Menge, die aus einer definierten biologischen Probe, wie beispielsweise bei Stuhlproben, isoliert werden kann, scheinen DNA-Amplifikationsansätze wie die PCR-Technik eine geeignete Methode zur Vervielfältigung der interessierenden DNA zu sein.

Hauptschwierigkeiten stellen jedoch Inhibitoren dar, die bei der Anwendung gängiger Extraktionsmethoden gemeinsam mit der Nukleinsäure der biologischen Probe isoliert werden, und die die in den Nukleinsäure-Amplifikationsansätzen einzusetzenden Enzyme inhibieren. So hat sich herausgestellt, daß die für die PCR erforderliche DNA-Polymerase inhibiert wird. Insbesondere Stuhlproben und Vollblut sind kritische biologische Ausgangsproben, da sie mit relativ großen Mengen an Inhibitoren behaftet sind.

Die durch die Reinigung und Isolierung anfallende Nukleinsäure (DNA, RNA) soll in hoher Reinheit vorliegen und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können. Die Inhibitoren müssen daher effizient und selektiv abgetrennt werden.

Üblicherweise wird die DNA aus Zellen isoliert. Dabei werden Zellen beispielsweise unter stark denaturierenden und gegebenenfalls reduzierenden Bedingungen aufgeschlossen. Weit verbreitet ist der Aufschluß der Zellen mit denaturierenden Substanzen, z. B. Detergenzien, und die Verwendung von

bestimmten Enzymen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren. So wird beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) als denaturierendes Agens verwendet, Proteinase K zum Abbau von Proteinen und RNase A zur Degradation von Ribonukleinsäuren (RNA). Zur vollständigen Denaturierung von Proteinen wird die DNA-haltige Lösung mit dem organischen Lösungsmittel Phenol extrahiert. Durch die anschließende Ethanolpräzipitation erfolgt die Konzentrierung der DNA und gleichzeitig die Entfernung verbleibender Phenolreste aus der deproteinierten, wässrigen Lösung. (Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, S. (1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor).

Die mit einem solchen Verfahren gewonnene DNA, z.B. aus abgeschilferten Darmepithelzellen von Stuhlproben, eignet sich nur begrenzt für den Einsatz in die sich anschließenden Folgereaktionen, insbesondere enzymatische Amplifikationsreaktionen, wie die PCR. So belegen jüngere Daten, daß sich nur in 103 Fällen von insgesamt 230 extrahierten Stuhlproben (Effizienz von 44,7%) die DNA mittels PCR amplifizieren läßt (Villa, E., Dugani, A., Rebecchi, A.M., Vignoli, A., Grottola, A., Buttafoco, P., Losi, L., Perini, M., Trande, P., Merighi, A., Lerose, R. and Manenti, F. (1996), Gastroenterology: 110:1346-1353).

Deuter et al. veröffentlichten 1995 eine Methode zur Isolierung von DNA aus Stuhlproben, die das beschriebene Verfahren zeitlich verkürzt und vereinfacht (Deuter, R., Pietsch, R., Hertel, S. and Müller, O. (1995), Nucl. Acids Res., 23:3800-3801). Die sich im Stuhl befindlichen abgeschilferten Darmepithelzellen werden lysiert und mit einem Adsorbens (Kartoffelmehl oder Kartoffelstärke oder Rinderserumalbumin) enthaltenden Puffer extrahiert. Zum Abbau von Proteinen, z.B. nukleinsäurespaltenden Enzymen, wird die DNA-haltige Lösung mit

der Proteinase K inkubiert. Die zeitliche Verkürzung dieses Verfahrens beruht darauf, daß die Phenolextraktion und anschließende Ethanolfällung durch die Verwendung von Zentrifugationssäulchen (QIAamp spin columns, QIAGEN GmbH) ersetzt werden. Während die DNA reversibel an eine Silikamembran in der Säule bindet, werden störende Verbindungen durch die Verwendung eines geeigneten Waschpuffers infolge der Wirkung von Zentrifugalkräften durch die Membran gepresst und somit abgereinigt. Durch Zugabe eines geeigneten Puffers wird die gereinigte DNA infolge eines Zentrifugationsschrittes von der Säule eluiert. Da sich jedoch Flüssigkeiten nicht vollständig aus solchen Membranen entfernen lassen, hat man immer mit einem Verlust der DNA-Ausbeute zu rechnen. Die nach diesem Verfahren gewonnene DNA liegt nicht in ausreichend guter Qualität ($A_{260}/A_{280} = 1,5$) und Menge (2 µg DNA/200 mg Stuhlprobe) vor. Folgereaktionen, insbesondere die PCR, erfordern eine hohe und reproduzierbare Ausbeute der DNA-Rohpräparate unter gleichzeitiger intensiver Abreinigung störender Inhibitoren.

Die Amplifikation eines definierten Gens/Genabschnitts der nach der von Deuter et al. beschriebenen Methode präparierten DNA mittels einer einfachen PCR zeigt eine Effizienz von 16 %. Auch durch eine nachfolgende Phenolextraktion dieser DNA läßt sich die Amplifikationseffizienz nur von 16 auf 40 % erhöhen.

Lediglich die Anwendung einer verschachtelten ("nested") PCR, die sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit und Sensitivität, bei gleichzeitiger Ausdünnung potentieller Inhibitoren, auszeichnet (Newton, C.R. and Graham, A. (1994), PCR, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland), erzielt eine erhöhte Amplifikationsausbeute von 66 %.

Es ist wünschenswert, die DNA in ausreichender Menge und in reproduzierbar guter Qualität zu isolieren, so daß definierte Gene/Genabschnitte in einer einfachen, d.h. nicht verschachtelten, PCR vervielfältigt werden können. Die

Durchführung einer verschachtelten PCR zeigt sich für bestimmte Anwendungen (z. B. routinemäßige Untersuchungen im diagnostischen Labor) nachteilig, da hier die Rate der falsch Positiven durch Produktkontaminationen erhöht ist.

5

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Reinigung bzw. Isolierung von Nukleinsäuren (DNA, RNA und dergl.) aus ungereinigten biologischen Proben wie Vollblut oder

10 Stuhlproben; dabei soll die Nukleinsäure in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen, so daß sie den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden kann. Die Effizienz für eine nachfolgende Nukleinsäure-Analysereaktion, insbesondere für Amplifikationsansätze wie die PCR, soll gesteigert werden.

15

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Reinigung, gegebenenfalls auch Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, wobei das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäure-haltige Probe mit einem Anionenaustauscher-

20 Kunstharz umgesetzt wird, welches eine Bindungsaffinität zu Gallensäuren besitzt, wobei Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analysereaktion an das Anionenaustauscherharz gebunden und abgetrennt werden.

25 Ein charakteristisches Merkmal der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung eines Gallensäure-bindenden Anionenaustauscher-Kunstharzes.

Die Bindungsaffinität des Anionenaustauscher-Kunstharzes gegenüber Gallensäuren, die vorzugsweise hoch ist, ist ein
30 Maßfaktor dafür, daß die Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließend durchzuführende Nukleinsäure-Analysereaktion, beispielsweise in der PCR-Reaktion, effizient gebunden und somit abgetrennt werden, während Nukleinsäuren nicht oder

schwächer gebunden werden und somit leicht wiedergewonnen werden können.

Der Grund, weshalb ein Anionenaustauscher-Kunstharz mit starker
5 Affinität gegenüber Gallensäuren sehr effizient die Inhibitoren bindet und abtrennt, ist nicht klar. Es kann jedoch vermutet werden, daß - obgleich Gallensäuren selbst offenbar nicht die Inhibitoren von Nukleinsäure-Analysereaktionen darstellen - die Gallensäurestruktur mit der einerseits permanent negativen
10 Carboxyl-Ladungsgruppe und dem andererseits relativ hydrophoben, in β -Stellung methylierten Steroid-Strukturbereich, welcher aber seinerseits üblicherweise durch hydrophile Hydroxylgruppen in α -Stellung derivatisiert ist, offensichtlich relativ gut die in den Inhibitoren vorliegende
15 grobe Strukturverteilung widerspiegelt, so daß eine analog starke Affinität zu den Inhibitoren besteht.

Ein weiteres überraschendes Ergebnis der vorliegenden Erfindung ist die sehr gute Selektivität des Anionenaustauscher-Harzes, das die Affinität zu Gallensäuren besitzt, zur Bindung der
20 Inhibitoren im Vergleich zur Bindung der Nukleinsäure, die in Gegenwart der Inhibitoren nicht oder schwächer gebunden werden. Gleichzeitig wird durch das erfindungsgemäße Verfahren die Nukleinsäure in hoher Reinheit zur Verfügung gestellt, typischerweise in einem über die Absorptionswerte bei 260 nm
25 und 280 nm erhaltenen Verhältnis A_{260}/A_{280} von über 1,5, insbesondere von über 1,7.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine ausreichende Abreinigung von Inhibitoren für gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Nachweisreaktionen unter gleichzeitigem Erhalt
30 einer genügend hohen Nukleinsäure-Konzentration sichergestellt.

Die für das erfindungsgemäß eingesetzte Kunstharz charakteristische Bindungsaffinität gegenüber Gallensäuren,

wobei typische Gallensäuren wie Cholsäure in Betracht kommen, liegt geeigneterweise im Bereich einer gegenüber z.B. Cholsäure ermittelten durchschnittlichen Bindungskapazität von mindestens 0,1 Äquivalente Cholsäure pro kg trockenem Kunstharz (eq/kg).

- 5 Vorzugsweise beträgt die durchschnittliche Bindungskapazität mindestens 0,5, weiter bevorzugt mindestens 1,0 und insbesondere mindestens 2,0 Äquivalente Cholsäure pro kg trockenem Kunstharz.

- Die Bindungskapazität gegenüber Gallensäuren kann ermittelt
10 werden durch Umsetzen einer definierten Menge an trockenem Kunstharz (50 g) mit einer angemessen konzentrierten Gallensäurelösung (1 gew.-%tige wässrige Lösung von Cholsäure) bei geeigneten Bedingungen bzgl. pH-Wert und Ionenstärke (z.B. pH 6,3 bei 0,9 gew.-%iger NaCl-Konzentration). Cholsäure läßt
15 sich leicht quantifizieren (s. z.B. J.L.Irvin et al. in „J.Biol.Chem.“, 153, 439 (1944)).

- Die Gesamt-Chloridaustauschkapazität des erfindungsgemäß eingesetzten Kunstharzes, bestimmt mittels üblicher
20 Titrationsmethode, beträgt vorzugsweise mehr als 4 eg/kg. Es ist aber zu berücksichtigen, daß die Gesamtzahl der aktiven, verfügbaren Anionenaustauschstellen nicht das eigentlich maßgebliche Kriterium zur wirksamen Bindung der Inhibitoren darstellt. Die in der Natur des Gallensäure-bindenden
25 Kunstharzes zugrundeliegende Charakteristik spielt hier eine weitere spezifische Rolle.

- Die Qualität der Bindung bzw. Abtrennung der Inhibitoren kann indirekt ermittelt werden durch die Bestimmung der Effizienz
30 einer anschließenden Nukleinsäure-Analysereaktion. Eine Bindung bzw. Abtrennung der Inhibitoren ist dann erreicht, wenn in der anschließenden Nukleinsäure-Analysereaktion eine Steigerung der Effizienz feststellbar ist, wobei die Effizienz vor der erfindungsgemäßen Reinigung, insbesondere bei durch Inhibitoren

stark verunreinigten Proben, bei null liegen kann. Für einen Vergleich ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen Menge und Heterogenität der Inhibitoren je nach biologischer Probe von der Untersuchung derselben biologischen Probe auszugehen.

5 Zum Beispiel bei Stuhlproben, die einen besonders hohen Gehalt an stofflich bisher nicht charakterisierten, heterogenen Inhibitor-Substanzen aufweisen, sollte wünschenswerterweise in einem Qualitätstest eine Effizienz von mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 60% und insbesondere mindestens 70%

10 erreichbar sein. Die Effizienz ist dabei definiert als der prozentuale Anteil der spezifisch festzustellenden PCR-Produkte in einem PCR-Analyseansatz, wobei eine einfache PCR-Reaktion, vorteilhafterweise aber unter Einsatz von Trägerprotein, durchgeführt wird, beispielsweise gemäß der untenstehenden

15 Beispiele.

Ein weiteres, überraschendes Ergebnis ergab sich aus einem Vergleich zu anderen, in Betracht kommenden, herkömmlichen basischen Anionenaustauscher-Materialien, wie einem FPLC-

20 MonoQTM-System, dem sogenannten GeneReleaserTM-System, einem Diethylaminoethyl-Celluloseionenaustauscher (DEAE-SephacellTM; DE-52) oder dem QiagenTM-Silika-Material: Obwohl es sich um das gleiche Prinzip eines Anionenaustausches handelt, bindet das erfindungsgemäß eingesetzte Anionenaustauscher-Harz die

25 Inhibitoren aus dem biologischen Ausgangsmaterial selektiver und effektiver, so daß die nachfolgenden Nukleinsäure-Analysereaktionen bereits bei Anwendung einer einfachen PCR sehr hohe Amplifikationsraten erbringen. Gemäß der Erfindung ergeben sich wesentlich bessere Resultate, und zwar bereits

30 beim Einsatz einer geringeren Menge an Anionenaustauscher-Harz, und ferner sind eine geringere Anzahl an Extraktionsschritten erforderlich; in der Regel reicht ein Inkubationsschritt aus.

Ein Vergleich herkömmlicher DNA-Reinigungs- und Isolierverfahren wurde vor kurzem von A.Kramvis et al. beschrieben in „Journal of Clinical Microbiology“, 34, 2731-2733 (1996).

- 5 Die mit der Erfindung erzielbare, selektive Abtrennung der Inhibitoren wird auch bei ungereinigten Ausgangsproben erreicht.

So hat sich das erfindungsgemäße Verfahren als besonders wirksam erwiesen bei bisher sehr problematischen

- 10 Ausgangsproben, z.B. bei Vollblut, das mit Citrat und EDTA oder der vermutlich PCR-inhibierenden Substanz Heparin behandelt wurde, sowie bei Stuhlproben, die aus der Lyse von im Stuhl abgeschilferten Darmepithelzellen stammen und einen hohen Anteil an nicht bekannten Inhibitoren aufweisen.

- 15 Selbstverständlich sind die Vorteile der Erfindung aber auch bei Anwendung auf beliebig andere biologische Proben erzielbar, beispielsweise anderen Proben aus dem menschlichen Körper, wie Körpersekreten, Gewebeproben, Urin u. dergl.

- 20 Das erfindungsgemäß eingesetzte Anionenaustauscher-Kunstharz ist ein basisches, insbesondere stark basisches Polymermaterial hohen Molekulargewichts (beispielsweise im Molekulargewichtsbereich von über $0,5 \cdot 10^6$, wie von $0,5$ bis $10 \cdot 10^6$, insbesondere 1 bis $5 \cdot 10^6$), welches im allgemeinen
25 aus einem mit tertiären und/oder quartären Ammoniumgruppen modifizierten organischen Polymer oder Copolymer aufgebaut ist und dessen charakteristisches Merkmal die vorstehend beschriebene Affinität zu Gallensäuren ist.

- 30 Das Harz-Polymer ist dabei auf besonders geeignete Weise gebildet aus einem Polystyrol, welches durch Divinylbenzol, vorzugsweise mit einem Anteil von $0,5$ bis 5 Gew.-% und insbesondere von $1 - 3$ Gew.-% Divinylbenzol quervernetzt ist

und in dessen Netzstruktur quartäre Ammoniumgruppen, geeigneterweise in Form von Benzyltrimethylammoniumgruppen, eingebaut sind.

Ein Beispiel für ein Anionenaustauscher-Kunstharz diesen

- 5 Polymer-Typs, das eine hohe Affinität zu Gallensäuren besitzt und bei dessen Einsatz ausgezeichnete Resultate erzielt wurden, ist Colestyramin (mittlere Bindungskapazität von Colestyramin gegenüber Cholsäure = 2,2 Äquivalente pro kg Harz-Trockengewicht). Colestyramin ist der internationale Freiname
- 10 für das Plasma-Cholesterinspiegel senkende Copolymere von Styrol (Vinylbenzol) und etwa 2 % Divinylbenzol mit in die Netzstruktur eingefügten quartären Ammoniumgruppen. Das Colestyramin-Granulat ist auf dem medizinisch-therapeutischen Gebiet bekannt als ein stark hydrophiles, wasserlösliches,
- 15 basisches Anionenaustauscherharz zur Bindung von Gallensäuren bei Gallensäurenverlustsyndromen und als Lipidsenker zur Behandlung von Hypercholesterinämie. Der Lipidsenker Colestyramin wird von der Firma STADapharm vertrieben.

- 20 Weitere Beispiele für einen, zum Einsatz für die vorliegende Erfindung grundsätzlich gut geeigneten Kunstharz-Typ bilden vernetzte Polyalkylamin-Anionenaustauscherharze. Das vernetzte Polyalkylamin-Anionenaustauscherharz ist dabei in der Regel als Copolymer aus einem Poly(niedrig)alkyl-Polyamin, beispielsweise
- 25 Diethylentriamin oder Tertaethylenpentamin, mit Epichlorhydrin (1-Chlor-2,3-epoxypropan) gebildet.

Ein Beispiel für ein Anionenaustauscher-Kunstharz diesen

- Polymer-Typs, das eine hohe Affinität zu Gallensäuren besitzt und bei dessen Einsatz ebenfalls ausgezeichnete Resultate
- 30 erzielt wurden, ist Colestipol (mittlere Bindungskapazität von Colestypol gegenüber Cholsäure = 1,1 Äquivalente pro kg Harz-Trockengewicht). Colestipol ist der internationale Freiname für das Serum-Cholesterinspiegel senkende Copolymere von Diethylentriamin und Epichlorhydrin. Das

Colestipolhydrochlorid-Granulat ist ebenfalls an sich bekannt als ein wasserunlösliches, basisches Anionenaustauscherharz zur Bindung von Gallensäuren bei Gallenstauung und Hypercholesterinämie (Lipidsenker). Colestipolhydrochlorid wurde von der Firma Upjohn entwickelt und kam 1977 auf den Markt.

Korrelierend mit der erhöhten Gallensäure-Bindungsaffinität ist die Reinigungseffizienz gegenüber den Inhibitoren beim Einsatz von Colestyramin im Vergleich zu Colestipol weiter erhöht.

10

Die das Kunstharz aufbauenden Polymere schließen neben den zuvor genannten Copolymeren auch andere Polymere und Copolymere sowie den Einsatz von substituierten Vertretern der die Copolymere aufbauenden, beispielhaft genannten Monomere ein, sofern in Analogie mit der Bindungsfähigkeit zu Gallensäuren die möglicherweise vorhandenen Inhibitoren in durch die Effizienzsteigerung der anschließenden Nukleinsäure-Analyse-reaktion feststellbarem Maße gebunden und abgetrennt werden.

20

Desweiteren können die erfindungsgemäß eingesetzten Anionenaustauscher-Harze weitere, an sich bekannte Additive in üblichen Mengen enthalten, wie z.B. Fließmittel.

Zur Ladungsabsättigung enthält das Anionenaustauscher-Harz zudem geeignete Salzpartner; die tertiären Ammoniumgruppen liegen geeigneterweise in der Hydrochlorid-Form vor, während quartäre Ammoniumgruppen geeigneterweise mit Chlorid assoziiert sind.

Vor der Umsetzung der Probe kann das einzusetzende Harz zunächst in geeigneter Trockenform vorliegen, beispielsweise als Granulat, oder es kann bereits in einer wässrigen Suspension vorliegen. Wird vom trockenen Harz ausgegangen, empfiehlt es sich, das Harz in einem geeigneten Puffer vorzuquellen, um wegen der hygroskopischen Eigenschaften des Harzes Verluste des Flüssigkeitsvolumens der verwendeten

30

biologischen Probe zu vermeiden. Die zur Umsetzung eingesetzte Harzsuspension ist üblicherweise gepuffert, geeigneterweise im Bereich von schwach sauer (etwa pH 5-6) bis schwach basisch (etwa pH 9-10).

5

Als Nukleinsäure kommen alle Nukleinsäurearten, insbesondere DNA und RNA, in Frage. Aufgrund der größeren Bedeutung, vor allem aber weil Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen in der Regel auf DNA-Proben aufgebaut sind (vgl. die PCR), wird die Erfindung im Folgenden stellvertretend vor allem zur Reinigung bzw. Isolierung von DNA weiter beschrieben.

Bei biologischen Ausgangsproben, bei denen die zu isolierende Nukleinsäure intrazellulär vorliegt, wie beispielsweise abgeschilferte Darmepithelzellen enthaltende Stuhlproben, sind die Zellen zunächst zu lysieren, um das intrazelluläre Material aufzuschließen.

Die Lyse bzw. der Aufschluß der Zellen kann durch eine gleichzeitige physikalische und chemische Einwirkung auf die körperzellenhaltige Probe erzielt werden. Das Probenmaterial kann vor der Lyse in tiefgefrorenem Zustand (-80 °C) vorliegen. Im Lysepuffer ist geeigneterweise ein denaturierendes Agens, z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS) oder andere Detergentien enthalten, welches den chemischen Aufschluß der Zellen bewirkt, während das Verrühren der Suspension, beispielsweise mit einem automatischen, mechanischen Rührsystem, den mechanischen Aufschluß begünstigt. Bei Stuhlproben hat sich gezeigt, daß bei sehr fester Konsistenz ein kräftiges Durchmischen der Probe mit einem Reagenzglasschüttler die Folgeanwendungen erleichtert. Durch einen Zentrifugationsschritt können Zelltrümmer, unverdaute Nahrungsmittelreste oder andere Makroreste entfernt werden.

Anschließend an die Lyse erfolgt die Behandlung des Nukleinsäure-haltigen Zellysats mit dem erfindungsgemäß eingesetzten, speziellen Anionenaustauscher-Harz. Das Harz kann in diesem Fall geeigneterweise in dem Lysepuffer vorgequellt werden.

Es hat sich gezeigt, daß bereits ein einmaliges Umsetzen des erfindungsgemäß eingesetzten Anionenaustauscher-Harzes eine ausreichende selektive Abreinigung der Inhibitoren ermöglichte.

10 Die eingesetzte Menge des speziellen Kunstharzes beträgt vorzugsweise 10 Gew.-% und weniger, bezogen auf das Gesamtgewicht der behandelten Probe. Oberhalb dieser Menge kann die Tendenz bestehen, daß nicht nur die Inhibitoren, sondern auch die gewünschte Nukleinsäure in zunehmendem Maße an das

15 Harz gebunden wird.

Es hat sich herausgestellt, daß eine zu häufige Wiederholung der batch-weisen Extraktion, insbesondere bei hohem Mengeneinsatz von über 10 Gew.-% sehr stark Gallensäure-bindender Kunstharze, zu einer nachteiligen Reduzierung der

20 Nukleinsäure-Menge führen kann. Die Ursache hierfür ist unklar. Es wird vermutet, daß das spezielle Harz zunächst die Inhibitoren bindet und dadurch abgesättigt wird. Fehlen jedoch die Inhibitoren in der wässrigen Lösung, kann das spezielle Harz aufgrund seiner Ladungseigenschaften verstärkt die

25 Nukleinsäure binden.

Eine wässrige, bis 10 gewichts-%ige, insbesondere 5 bis 10 gewichts-%ige Suspension des Kunstharzes bindet die Inhibitoren in ausreichender Menge und setzt gleichzeitig die Menge der in der wässrigen Lösung vorliegenden DNA nicht oder nur

30 unwesentlich herab.

Geeigneterweise steht dabei die eingesetzte Menge an Kunstharz zu der Häufigkeit der Umsetzung in einem umgekehrten Verhältnis. Das heißt, bei einem relativ hohen Gehalt,

insbesondere bei 7,5 bis 10 Gew.-% Harzsuspension in wässrigem Medium, ist eine einmalige Umsetzung vorzuziehen, während im mittleren Gehaltsbereich, etwa von 2,5 bis 7,5 Gew.-% und insbesondere um 5 Gew.-% (± 1 Gew.-%), eine zwei- oder mehr-
5 malige Umsetzung bessere Resultate liefert. Das vorzugsweise zu wählende Verhältnis von Harzgehalt zu Häufigkeit der Umsetzung hängt aber auch von dem jeweils zu untersuchenden Probenmaterial ab. So ist bei Stuhlproben ein einmaliges Umsetzen mit 10 Gew.-% oder ein zweimaliges Umsetzen mit
10 jeweils 5 Gew.-% Copolymer-Harz gut geeignet. Bei Vollblut sind Gehaltsbereiche unter 5 Gew.-% vorzuziehen, wobei ein zweimaliges Umsetzen mit jeweils 2,5 Gew.-% Copolymer-Harz besonders gut geeignet ist.

- 15 Beim Umsetzen wird am einfachsten die Nukleinsäure-haltige (ggf. nicht vorgereinigte) Probe mit der Harz-Suspension versetzt, sehr gut gemischt, und dann wieder vom Copolymeren-Harz abgetrennt. Letzteres kann bequem durch ein Abzentrifugieren des Harzgranulats erfolgen.
- 20 Das Umsetzen kann aber auch mittels einer Trennung über ein das spezielle Anionenaustauscher-Harz einsetzende Chromatographie-System erfolgen.

Anschließend an die Inhibitorabreinigung kann die DNA weiter
25 gereinigt und isoliert werden. Vorteilhaft ist es, hierfür zunächst unspezifisch wirkende Proteinase K einzusetzen, um Proteine und Nukleinsäure-spaltende Enzyme abzubauen. Danach erhält man eine viskose, gallertartige Flüssigkeit. Daraus wird die DNA vorzugsweise mittels
30 Phenolextraktion und anschließender Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase isoliert. Alternativ läßt sich die DNA durch die Verwendung eines Detergens, beispielsweise eines chaotropen, Guanidin-haltigen Detergens (wie DNazolTM von Gibco BRL), mit anschließender Ethanolfällung aus der wässrigen Phase

- isolieren. Dazu wird die DNA-haltige, mit Proteinase K verdaute Lösung mit dem Detergens und Ethanol versetzt und sofort durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert. Da weder organische Lösungsmittel (Phenol, Chloroform) eingesetzt werden, noch
- 5 mehrere Zentrifugationsssschritte zur Extraktion nötig sind, ist dieses Verfahren sehr anwenderfreundlich und zeitersparend. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Phenol oder chaotropen Detergentien zur Isolierung von DNA kann alternativ durch den Gebrauch von für diesen Zweck bekannten
- 10 Zentrifugationssäulchen ersetzt werden, beispielsweise durch QIAamp-spin columns™ von Qiagen™. Hierbei eignet sich zur Zellyse sowohl ein Proteinase K-Verdau, sowie die Verwendung von kommerziell erhältlichen Lysepuffern (z. B. AVL-Puffer des QIAamp Viral RNA Kits™ von Qiagen, Hepatitis C Virus-
- 15 Lysereagenz des Amplicor HCV Kits™ der Hoffmann-La Roche AG). Bei der Verwendung der käuflichen Lysepuffer erfolgt die Behandlung der Proben analog dem jeweiligen Protokoll der Hersteller.
- 20 An die Reinigung bzw. Isolierung der DNA bzw. RNA können sich dann - je nach Wunsch - Folgereaktionen anschließen. Die hierfür erforderliche Qualität der Nukleinsäureprobe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Verfügung gestellt. Die erfindungsgemäße Verfahrensweise gewährleistet eine Präparation
- 25 der Nukleinsäure mit hoher Ausbeute (beispielsweise 10-20 µg DNA pro 200 mg Stuhlprobe) und Reinheit ($A_{260/280} = 1,7 - 1,9$) unter Abreinigung von Inhibitoren enzymatischer Reaktionen und erlaubt es, eine qualitativ reproduzierbare Analytik
- 30 Verfahren zur Amplifikation von DNA.

Es hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren in besonders günstiger Weise mit einer PCR-Amplifikation kombiniert werden kann, wobei bereits eine einfache PCR in über

60 %, teilweise in über 80 % aller untersuchten Stuhlproben zum Erfolg führte.

Bei einer Amplifikation der isolierten Stuhl-DNA mittels einer verschachtelten PCR konnte sogar in bis zu 100 % der getesteten
5 Proben das erwartete Amplifikat erhalten werden.

Die gemäß dem erfindungsgemäßen Reinigungsverfahren gereinigte bzw. isolierte DNA wird vorzugsweise einer PCR unterworfen, die in Gegenwart eines Trägerproteins, wie Rinderserumalbumin
10 (BSA), ausgeführt wird. Die Trägerproteinkonzentration wird dabei hoch gewählt, vorzugsweise mehr als 50 µg/ml. Sehr gute Amplifikationsraten haben sich bei Trägerprotein-Konzentrationen im Bereich von 120 - 200 µg/ml ergeben.

Weiterhin wirken sich relativ hohe Konzentrationen an für die

15 PCR erforderlichen Nukleotiden (Desoxyribonukleosid-Triphosphate), Primer und DNA-Polymerasen wie der *Taq*-DNA-Polymerase vorteilhaft aus. Die Nukleotidkonzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von 150-225 µM. Gleichzeitig liegt die Primerkonzentration im Bereich von 0,75 bis 1,25 µM. Der Gehalt
20 an DNA-Polymerase liegt geeigneterweise im Bereich von 2 bis 3 Units pro 50 µl-Ansatz.

Die Amplifikation erfolgt hinsichtlich der beabsichtigten routinemäßigen Anwendung im diagnostischen Labor vorzugsweise durch eine einfache PCR, in der 30-35 Temperaturzyklen
25 durchlaufen werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Isolierung von DNA aus einer Stuhlprobe:

- 5 200 mg Stuhlmaterial wird für die Dauer von mindestens einer Stunde bei -80 °C tiefgefroren, anschließend mit 600 µl Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 % SDS, pH 9,0) versetzt und homogenisiert. Die lysierte Probe wird 10 min. bei 4 °C und 6000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge
- 10 zentrifugiert, um grobe Stuhlpartikel, Zelltrümmer, Bakterien und Nahrungsmittelreste abzutrennen. Der Überstand wird ein zweites Mal bei 4 °C, 20000 x g 10 min. zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird mit dem gleichen Volumen einer Colestyramin-Lösung (5 % Colestyramin in Lysepuffer) versetzt,
- 15 gut durchmischt, 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei 20000 x g zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Extraktionsschrittes wird der klare Überstand mit der Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56 °C inkubiert. Die verdaute Probe wird mit dem
- 20 gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt, gut durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur und 20000 x g abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) versetzt und wie
- 25 oben beschrieben zentrifugiert. Aus der wässrigen, oberen Phase kann die DNA durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100 %igem Ethanol, pelletiert werden. Das in 75 %igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird
- 30 in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 10-15 µg pro 200 mg Stuhlprobe mit einem $A_{260/280}$ -Verhältnis von 1,7. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einem 50 µl-PCR-Ansatz

eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch setzt sich wie folgt zusammen:

10 mM Tris-HCl, pH 8,3

50 mM KCl

5 2,0 mM MgCl₂

200 µM jedes dNTP

160 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)

1 µM jeder Primer

2,5 U Taq-DNA-Polymerase pro 50 µl-Ansatz

10

Beispiel 2

Alternative Isolierung von DNA aus einer Stuhlprobe:

15

200 mg Stuhlmaterial wird für die Dauer von mindestens einer Stunde bei - 80 °C tiefgefroren, anschließend mit 600 µl

Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 % SDS, pH 9,0) versetzt und homogenisiert. Die lysierte Probe wird 10

20 min. bei 4 °C und 5000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge

zentrifugiert, um grobe Stuhlpartikel, Zelltrümmer, Bakterien und Nahrungsmittelreste abzutrennen. Der Überstand wird ein

zweites Mal bei 4 °C, 13000 x g 10 min. zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird mit dem gleichen Volumen einer

25 Colestipolhydrochlorid-Lösung (10 % Colestipolhydrochlorid in

Lysepuffer) versetzt, gut durchmischt, 2 min. bei

Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei 13000 x g zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses

Extraktionsschrittes wird der klare Überstand mit der

30 Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56 °C

inkubiert. Die verdaute Probe wird mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1)

versetzt, gut durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur und

13000 x g abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird ein

weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Aus der wässrigen, oberen Phase kann die DNA durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100 %igem Ethanol, entfernt werden. Das in 75 %igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 15-20 µg pro 200 mg Stuhlprobe mit einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,9. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einen 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch ist identisch mit demjenigen des Beispiels 1.

15

Beispiel 3

Isolierung von DNA aus Vollblut:

500 µl Citrat-, Heparin- oder EDTA-Blut oder tiefgefrorenes und wieder aufgetautes Blut werden mit 500 µl Lysepuffer (500 mM Tris, 75 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 % SDS, pH 9,0) versetzt und gut durchmischt. Die DNA-haltige Lösung wird mit dem gleichen Volumen einer Colestyramin-Lösung (2,5 % Colestyramin in Lysepuffer) versetzt, gut durchmischt, 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben bei 20000 x g zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Extraktionsschrittes wird der klare Überstand mit der Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) 2 Stunden bei 56 °C inkubiert. Die verdaute Probe wird mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gut durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur und 20000 x g abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wird ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) versetzt und wie oben beschrieben

zentrifugiert. Nach effizienter Lyse aller eukaryontischen und/oder prokaryontischen Zellen und/oder Viren (gleichzeitige Inaktivierung infektiöser Pathogene) und durch Denaturierung und enzymatischen Abbau von Proteinen (gleichzeitige Entfernung der an die Nukleinsäure gebundenen Proteine) kann die DNA aus der wässrigen, oberen Phase durch eine Ethanolpräzipitation, durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen 100 %igem Ethanol, pelletiert werden. Das in 75 %igem Ethanol gewaschene und bei Raumtemperatur getrocknete DNA-Pellet wird in 30 µl destilliertem Wasser gelöst. Die DNA-Ausbeute beträgt 5 - 10 µg pro 500 µl Vollblut mit einem $A_{260/280}$ -Verhältnis von 1,7. 5 µl dieser DNA-Lösung werden zur Amplifikation definierter Gene/Genabschnitte in einem 50 µl-PCR-Ansatz eingesetzt. Das Amplifikationsgemisch ist identisch mit demjenigen des Beispiels 1.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Reinigung, gegebenenfalls auch Analyse, von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren den Schritt umfaßt, daß die Nukleinsäurehaltige Probe mit einem Anionenaustauscher-Kunstharz umgesetzt wird, welches eine Bindungsaffinität zu Gallensäuren besitzt,
- 10 wobei die möglicherweise vorhandenen Inhibitoren für die gegebenenfalls anschließende Nukleinsäure-Analysereaktion an das Anionenaustauscherharz gebunden und abgetrennt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das
- 15 Anionenaustauscher-Kunstharz ein Polystyrol-Copolymer, welches mit Divinylbenzol vernetzt und durch den Einbau von tertiären und/oder quartären Ammoniumgruppen stark basisch gemacht wurde, umfaßt.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Copolymer Colestyramin verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Anionenaustauscher-Kunstharz ein Polyalkylamin-Harz umfaßt.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Copolymer aus Polyethylenpolyamin- und Epichlorhydrin-Monomeren gebildet wurde.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Copolymer Colestipol verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Umsetzung der Gehalt des

Anionenaustauscher-Kunstharzes in einer Harzsuspension 10 Gew.-% nicht übersteigt.

5 8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure nach der Umsetzung mit dem Anionenaustauscher-Kunstharz durch einen Isolierschritt isoliert wird.

10 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Isolierschritt durch Phenolextraktion mit anschließender Alkoholpräzipitation erfolgt.

15 10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die gereinigte Nukleinsäure zur nachfolgenden Analyse einer Polymerase-Kettenreaktion unterworfen wird.

20 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerase-Kettenreaktion in Gegenwart von Trägerprotein erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerprotein-Konzentration mehr als 50 µg/ml beträgt.

25 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Polymerase-Kettenreaktionsansatz 120-200 µg/ml Trägerprotein, 150-225 µM von jedem eingesetzten Desoxyribonukleosid-Triphosphat und 0,75-1,25 µM von jedem eingesetzten Primer enthält.

30

14. Verwendung von Colestyramin zum Reinigen und/oder Isolieren und gegebenenfalls anschließenden Analysieren von Nukleinsäuren aus biologischen Proben.

15. Verwendung von Colestipol zum Reinigen und/oder Isolieren und gegebenenfalls anschließenden Analysieren von Nukleinsäuren aus biologischen Proben.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 233 (C-1195), 28 April 1994 & JP 06 023281 A (BABCOCK HITACHI KK), 1 February 1994, see abstract	1-3, 7-14
Y	---	4-6, 15
Y	DE 41 36 322 A (HOECHST AG) 6 May 1993 see the whole document	4-6, 15
Y	---	
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 002, 29 February 1996 & JP 07 277993 A (SEKISUI CHEM CO LTD), 24 October 1995, see abstract	1-3, 7-14
Y	---	
Y	EP 0 270 017 A (MOLECULAR BIOSYSTEMS INC) 8 June 1988 see claims and examples	1-3, 7-14

	---/---	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 1998

Date of mailing of the international search report

19/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 97/05129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEUTER R. ET AL.,: "A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR" NUCLEIC AIDS RESEARCH, vol. 23, no. 18, - 25 September 1995 pages 3800-3801, XP002017414 see the whole document ---	1
A	WIDJOJOATMODJO M. N. ET AL.,: "The magnetic immuno polymerase chain raction assay for direct detetction of salmonellae in fecal samples" J. CLIN. MICROBIOLOGY, vol. 30, no. 12, - December 1992 pages 3195-3199, XP002054106 see whole document esp. abstract and discussion ---	1-15
P, X	KRAMVIS A. E AL.,: "Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, genereleaser, and the Phenol-chloroform method" J. CLIN. MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 11, - November 1996 pages 2731-2733, XP002054107 cited in the application see whole document esp. materials and methods ---	1
A	FR 2 391 730 A (BRISTOL MYERS CO) 22 December 1978 see the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. Patent Application No

PCT/EP 97/05129

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4136322 A	06-05-93	NONE	
EP 0270017 A	08-06-88	US 4935342 A	19-06-90
		AU 600997 B	30-08-90
		AU 8192787 A	16-06-88
		CA 1313359 A	02-02-93
		DK 631687 A	02-06-88
		JP 2564335 B	18-12-96
		JP 63154696 A	27-06-88
FR 2391730 A	22-12-78	DE 2822546 A	07-12-78
		GB 1573487 A	28-08-80
		JP 54017133 A	08-02-79
		ZA 7802729 A	27-06-79

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 233 (C-1195), 28. April 1994 & JP 06 023281 A (BABCOCK HITACHI KK), 1. Februar 1994,	1-3, 7-14
Y	siehe Zusammenfassung ---	4-6, 15
Y	DE 41 36 322 A (HOECHST AG) 6. Mai 1993 siehe das ganze Dokument ---	4-6, 15
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 002, 29. Februar 1996 & JP 07 277993 A (SEKISUI CHEM CO LTD), 24. Oktober 1995, siehe Zusammenfassung ---	1-3, 7-14
Y	EP 0 270 017 A (MOLECULAR BIOSYSTEMS INC) 8. Juni 1988 see claims and examples ---	1-3, 7-14
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Februar 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/02/1998

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DEUTER R. ET AL.,: "A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR" NUCLEIC AIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 18, - 25.September 1995 Seiten 3800-3801, XP002017414 siehe das ganze Dokument ---	1
A	WIDJOJOATMODJO M. N. ET AL.,: "The magnetic immuno polymerase chain raction assay for direct detetction of salmonellae in fecal samples" J. CLIN. MICROBIOLOGY, Bd. 30, Nr. 12, - Dezember 1992 Seiten 3195-3199, XP002054106 see whole document esp. abstract and discussion ---	1-15
P,X	KRAMVIS A. E AL.,: "Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, genereleaser, and the Phenol-chloroform method" J. CLIN. MICROBIOLOGY, Bd. 34, Nr. 11, - November 1996 Seiten 2731-2733, XP002054107 in der Anmeldung erwähnt see whole document esp. materials and methods ---	1
A	FR 2 391 730 A (BRISTOL MYERS CO) 22.Dezember 1978 siehe das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05129

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4136322 A	06-05-93	KEINE	
EP 0270017 A	08-06-88	US 4935342 A	19-06-90
		AU 600997 B	30-08-90
		AU 8192787 A	16-06-88
		CA 1313359 A	02-02-93
		DK 631687 A	02-06-88
		JP 2564335 B	18-12-96
		JP 63154696 A	27-06-88
FR 2391730 A	22-12-78	DE 2822546 A	07-12-78
		GB 1573487 A	28-08-80
		JP 54017133 A	08-02-79
		ZA 7802729 A	27-06-79